

Evaluación de la Locomoción en Ratones con Trasplante de Glía Envlovente Olfatoria en la Corteza Retrosplenial

Tania Campos Ordoñez¹, Frida Margarita Pantoja Martínez¹, Nidia Jannette Carrillo-González¹, Jonathan Buriticá², Graciela Gudiño Cabrera^{1*}

¹Laboratorio de Desarrollo y Regeneración Neural, Departamento de Biología Celular y Molecular, Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad de Guadalajara. Guadalajara, Jalisco, México.

²Centro de Estudios e Investigaciones en Comportamiento, Universidad de Guadalajara. Guadalajara, Jalisco, México.

Nota de Autor

Graciela Gudiño-Cabrera  <https://orcid.org/0000-0003-3170-6535>

Tania Campos-Ordoñez  <https://orcid.org/0000-0001-7452-3435>

Sin conflictos de interés por declarar.

Agradecimiento al Programa de Apoyo a la Mejora en las Condiciones de Producción de los Miembros del SNII y SNCA PROSNII y al Programa de Fortalecimiento de la Universidad de Guadalajara. Agradecemos el apoyo técnico de Gabriela Escobar-Camberos, Aranza Galindo-Siller y Lizeth Vázquez-Muro.

La correspondencia relacionada a este artículo deberá dirigirse a Graciela Gudiño-Cabrera y/o Tania Campos-Ordoñez. Laboratorio de Desarrollo y Regeneración Neural, Departamento de Biología Celular y Molecular, Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad de Guadalajara. Zapopan, Jalisco, México. Correo electrónico: graciela.gudino@academicos.udg.mx, tania.campos@academicos.udg.mx

Resumen

Introducción. La terapia celular de glía envolvente (GE) olfatoria es un candidato atractivo para el trasplante tópico de células en lesiones invasivas. En roedores con lesión en la médula espinal, la GE promueve el crecimiento de neuritas, remielinización, fagocitosis del tejido dañado y modulación del sistema inmunológico. La corteza retrosplenial (CR) es un área de asociación cerebral susceptible a daños secundarios por aneurisma, traumatismo craneoencefálico, tumores, entre otros. Debido a sus conexiones múltiples con otras áreas cerebrales la CR está implicada en funciones cognitivas y motoras. No obstante, aún se desconoce la inocuidad del trasplante de GE en la CR y si puede afectar la locomoción de ratones. *Objetivo.* Evaluar el efecto del trasplante de GE en la CR sobre la locomoción de ratones adultos. *Método.* Ratones adultos de la cepa CD1 (60 días postnatales) fueron donadores de los bulbos olfatorios, estos fueron procesados por cultivo celular primario para obtener el trasplante de GE. Los receptores del trasplante también fueron ratones adultos sometidos a cirugía estereotáxica en dos grupos: GE y *sham*. Después de 21 días de la cirugía, los ratones fueron expuestos a una prueba de campo abierto para evaluar distancia recorrida, velocidad, inmovilidad, tiempo de permanencia en las zonas del centro y periferia. *Resultados.* Después de 21 días de la cirugía, la administración de GE en la CR no afectó ningún parámetro de la prueba de campo abierto. *Conclusión.* El trasplante de GE en la CR no afecta la locomoción en ratones adultos.

Palabras claves: movilidad, corteza retrosplenial, glía envolvente olfatoria, terapia regenerativa, ratones

Assessment of Locomotion in Mice with Olfactory Ensheathing Cells Transplantation in the Retrosplenial Cortex

Abstract

Introduction. Cell therapy with olfactory ensheathing cells (OEC) is an attractive candidate for topical cell transplantation in invasive injuries. OEC promotes neurite growth, remyelination, damaged tissue phagocytosis, and immune system modulation in rodents with spinal cord injury. The retrosplenial cortex (RC) is a brain association area susceptible to secondary damage from aneurysms, traumatic brain injury, and tumors, among other causes. Due to its multiple connections with other brain areas, RC participates in cognitive and motor functions. However, the safety of OEC transplantation in the CR and its potential impact on the locomotion of mice remain unknown. *Objective.* To evaluate the effect of OEC transplantation in the RC on locomotion in adult mice. *Method.* Adult CD1 strain mice (60 days postnatal) were donors of the olfactory bulbs (OB), which were processed through primary cell culture to obtain the OEC transplant. The transplant recipients were also adult mice exposed to stereotaxic surgery in two groups: OEC and *sham*. After 21 days of surgery, the mice performed an open field test to analyze their distance traveled, speed, immobility, and time spent in the center and periphery zones. *Results.* After 21 days of surgery, the administration of OEC in the RC did not affect any parameter of the open-field test. *Conclusion.* OEC transplantation in the RC does not affect locomotion in adult mice.

Keywords: mobility, retrosplenial cortex, olfactory ensheathing cells, regenerative therapy, mice

Evaluación de la Locomoción en Ratones con Trasplante de Glía Envlovente Olfatoria en la Corteza Retrosplenial

La corteza retrosplenial (CR) es una región parietal dorsomedial que participa en diversas funciones cognitivas, como la memoria episódica, la navegación y la memoria espacial (Takeuchi et al., 2022). Desde un punto de vista anatómico, la CR recibe señales de las redes del hipocampo dorsal y, a su vez, envía proyecciones a áreas neocorticales (Mitchell et al., 2018; Yamawaki et al., 2016). Al estar interconectada con otras áreas corticales como la corteza motora primaria y secundaria, somatosensorial y auditiva también está implicada en el desarrollo de la actividad locomotora, balance y coordinación durante la navegación (Hao et al., 2024; Motanis et al., 2021; Shibata y Naito, 2008; Yamawaki et al., 2016). Daños unilaterales o bilaterales en la CR causados por glioblastoma, infarto o angioma se han relacionado con amnesia. Daños en el hemisferio izquierdo de la CR se han asociado con alteraciones en la memoria declarativa o la habilidad de recordar eventos diarios, mientras que daños en el hemisferio derecho están asociados con alteraciones en la navegación o desorientación topográfica (Maguire, 2012; Mitchell et al., 2018; Ruggiero et al., 2014). En modelos experimentales en animales, la aspiración total de la CR produce daños en la memoria espacial de roedores evaluados con el laberinto en T y el laberinto acuático de Morris (Vann y Aggleton, 2002). Debido a que la CR juega un papel crucial en diversas funciones cognitivas y motoras, es fundamental encontrar tratamientos terapéuticos efectivos para mitigar los efectos de los daños en esta región.

Las células de la glía envlovente (GE) olfatoria forman parte del tejido del sistema olfatorio tanto de humanos como de roedores (Miah et al., 2021). Estas células son cruciales para apoyar y guiar los axones sensoriales olfativos recién formados desde su origen en el sistema nervioso periférico (SNP) de la mucosa olfatoria (MO) hasta establecer conexiones sinápticas con sus objetivos en el sistema nervioso central (SNC) del bulbo olfatorio (BO), facilitando así la detección de olores (Gómez et al., 2007; Miah et al., 2021). Los estudios con animales muestran que el trasplante de GE constituye un candidato atractivo para el trasplante tóxico de células en lesiones invasivas (Gudiño-Cabrera et al., 2000; Verdú et al., 2001). Los efectos terapéuticos después de daño en la médula espinal incluyen restauración de funciones motoras (Nakhjavan-Shahraki et al., 2018), el crecimiento de neuritas, reducción en la formación de cicatrices, fagocitosis, modulación del sistema inmunológico, remielinización de axones y plasticidad neuronal (Miah et al., 2021; Watzlawick et al., 2016). Actualmente, son pocos los estudios que han explorado el potencial terapéutico de la GE en el cerebro. Específicamente la GE se ha administrado en la corteza de asociación parietal (Wang et al., 2014) y el hipocampo (Liu et al., 2015). Por lo tanto, los efectos de la administración de GE en la corteza retrosplenial aún se desconocen. Dada la conexión de la CR con áreas relacionadas con la locomoción, evaluar el efecto de la inyección de GE en esta región proporcionaría información valiosa sobre su inocuidad y su impacto en la locomoción. Por ello, el objetivo de este estudio fue evaluar el efecto del trasplante de GE administrado en la CR derecha sobre la locomoción de ratones adultos.

Método

Para realizar cada trasplante ($n = 3$) se necesitaron los bulbos olfatorios de tres ratones adultos macho de la cepa CD1 (P60), por lo que fueron requeridos 9 ratones en total para generar los trasplantes. Para la administración de las células de GE se utilizaron ratones adultos de la misma cepa. El tamaño de la muestra fue calculado usando la fórmula para variables continuas: $n = 1 + 2C (s/d)^2$, donde **C** es una constante relacionada con los valores de α y β (nivel de significancia y potencia, respectivamente), **s** es la desviación estándar conocida y **d** es el cambio en la variable que nos gustaría detectar (National Research Council, 2003). Los ratones fueron divididos en dos grupos ($n = 8$ ratones por grupo): 1) Inyección de las células de GE; y 2) *sham* (inyección de la solución vehículo). Después de la cirugía, todos los ratones fueron sometidos a una inspección visual diaria para verificar su integridad física (Burkholder et al., 2012). La evaluación conductual se realizó después de 21 días de la aplicación del trasplante. Todos los animales fueron alojados en condiciones de bioterio en jaulas de alojamiento estándar (28 x 12 x 15 cm) en una habitación con temperatura controlada ($23 \pm 2^\circ\text{C}$). Todos los grupos estuvieron alimentados e ingesta libre de agua (*ad libitum*), humedad entre 40-60%, ciclo de luz-oscuridad 12:12 h. Los experimentos se realizaron de acuerdo con los lineamientos de las regulaciones oficiales mexicanas que rigen el uso de animales de laboratorio (NOM-062-ZOO-1999 y NOM-033-ZOO-1995).

Cultivo Primario de GE

Se extrajeron los bulbos olfatorios de ratones adultos de la cepa CD1 (P60). Se diseccionaron en las capas de fibras nerviosas glomerulares y el tejido se disoció con tripsina (2.5 mg/ml, Sigma-Aldrich). Se pasó a través de una malla estéril de 70 μm (Becton Dickinson). Las células se sembraron en medio *Dulbecco's Modified Medio Eagle (DMEM) en proporción 1:1 con DMEM-F12* (DMEM/DMEM-F12) y medio suplementado con suero bovino fetal (SFB) al 10%, a una densidad de aproximadamente 2.5×10^4 células/cm² en frascos de cultivo de 25 cm² (NUNC), previamente tratados con una solución de 10 $\mu\text{g/ml}$ de poli-L-lisina (Sigma-Aldrich) y se mantuvieron en condiciones de cultivo estándar (5% CO₂, 37°C) (Bautista-González et al., 2023). Al segundo pase celular, el medio suplementado con 10% de SFB fue reemplazado por medio un medio libre de suero suplementado con B27. Después de 15 días cuando la confluencia celular alcanzó aproximadamente el 80%, las células se recuperaron mediante la adición de tripsina (2.5 mg/ml, Sigma-Aldrich), la cual fue inactivada en medio suplementado con 10% de SFB, las células se centrifugaron a 200 *g* y se contabilizaron para posteriormente ser congeladas en medio de criopreservación a -60°C .

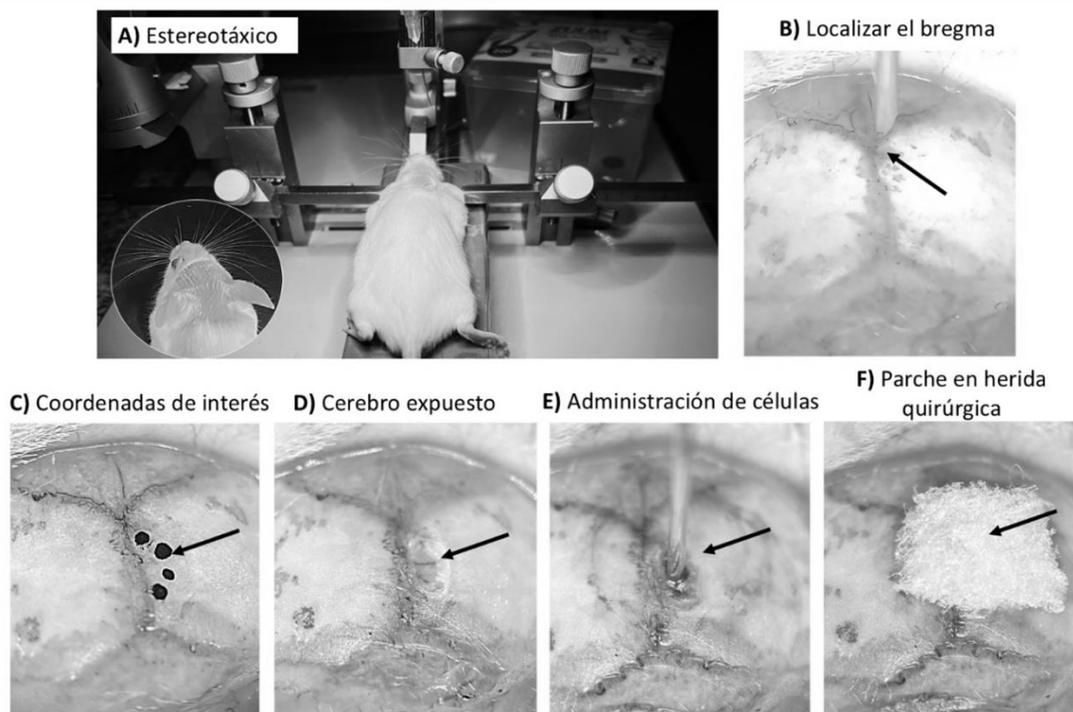
Procedimiento Quirúrgico

Previo a la inyección unilateral de las células de GE en la CR, estas fueron descongeladas en medio suplementado con 10% de SFB, se centrifugaron a 200 *g* y se concentraron en medio libre de suero DMEM/DMEM-F12. El procedimiento quirúrgico se realizó como se ha descrito previamente (Campos-Ordoñez y González-Pérez, 2021; Campos-Ordoñez et al., 2023). Los ratones fueron anestesiados vía intraperitoneal a una dosis dependiente de peso con 90 mg/kg de ketamina (Anesket, PiSA) y 10 mg/kg de xilacina (Procin, PiSA) precalentado a 37°C. Los animales fueron colocados en un aparato estereotáxico. En la piel de la cabeza se les realizó

una incisión con un bisturí estéril N° 15, que se extendió desde las orejas del ratón hasta la línea lambda del cráneo. Después con la punta de una aguja 30-G montado en el aparato estereotáxico, se señaló el Bregma en el vértice y se estableció la coordenada "cero". Posteriormente, se marcó de -1.06 mm a -2.06 mm (coordenadas anterior-posterior relativas al Bregma, respectivamente); de cero a 1 mm (coordenadas medial-lateral relativas al Bregma); -1.2 mm de profundidad, lo cual corresponde a la corteza retrosplenial anterior derecha (Paxinos y Franklin, 2001). En el punto de set se realizó la craneotomía utilizando un taladro (Dremel; Minimite, Model 750) con una fresa de 1 mm (Dremel; Mod. 105, Cat. 26150105AE), después se administró la cantidad de 7,500 células vivas de GE suspendidas en 300 nL de medio DMEM/DMEM-F12 como vehículo con ayuda de una jeringa Hamilton (Figura 1). El grupo *sham* o tratamiento simulado se sometió a procedimientos idénticos, pero la inyección unilateral fue únicamente con la solución vehículo DMEM/DMEM-F12. La herida quirúrgica fue cerrada, y para la recuperación de la anestesia los animales fueron colocados en una jaula que tenía una cama limpia y con una lámpara que brindaba calor. Se administró analgesia mediante una inyección subcutánea de ketorolaco (Senosiain, Cat. 15005-B) a una dosis dependiente del peso de 0.5 mg/kg, cada 12 horas durante 1 día.

Figura 1

Pasos durante la cirugía estereotáxica para administrar el trasplante de células de GE



Nota. (A) El ratón con el pelo rasurado de la cabeza es colocado en el aparato estereotáxico. (B) Se realiza una incisión de la línea media de la cabeza hacia las orejas para dejar visible el cráneo y localizar el bregma. (C) Se seleccionan y marcan las coordenadas de interés. (D) Se rebaja el grosor del cráneo y se deja a nivel de la dura madre, esta última capa es retirada manualmente con unas pinzas de microcirugía. (E) Con una jeringa *Hamilton*® se administran las células de GE en las coordenadas correspondientes. (F) Finalmente, la herida quirúrgica fue cerrada con un parche del *gelfoam*®.

Campo Abierto

Para evaluar el efecto de la inyección de GE en la CR derecha sobre la locomoción de ratones adultos, 21 días después de la cirugía se utilizó la prueba de campo abierto (Tatem et al., 2014). Los cambios en la locomoción pueden indicar la presencia de procesos neurológicos anómalos, reflejando así una disfunción cerebral. Además, esta prueba suele emplearse para evaluar la salud general y el bienestar del animal, ya que aquellos en mal estado de salud suelen mostrar una menor actividad locomotora y exploración dentro de la arena (Guest, 2019). Este aparato consiste en una arena (58 x 58 x 40 cm), en la cual cada ratón fue colocado al centro de una arena y se le permitió explorar de forma libre por 5 minutos. Los videos fueron analizados de forma automatizada por el software *ANY Maze 7.4*. Los parámetros utilizados para evaluar tanto la locomoción como la exploración de la arena fueron: el total de distancia recorrida (m), velocidad (m/s), duración de tiempo de movimiento (s), tiempo de permanencia en el centro (s) y tiempo de permanencia en la periferia (s).

Método Estadístico

Una vez obtenidos los resultados se aplicó la prueba de normalidad Shapiro-Wilk y, posteriormente, para evaluar diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos se utilizó la prueba de U de Mann-Whitney. La probabilidad tuvo un valor de $p < 0.05$ para establecer las diferencias estadísticamente significativas entre grupos. Para el análisis y la representación de los datos, se utilizó el software GraphPad Prism 8.0.2. Se graficaron diagramas de caja y bigotes con la mediana (rango intercuartil [Q3-Q1]). Se utilizó la d de Cohen para evaluar el tamaño del efecto, empleando el programa R versión 4.4.2.

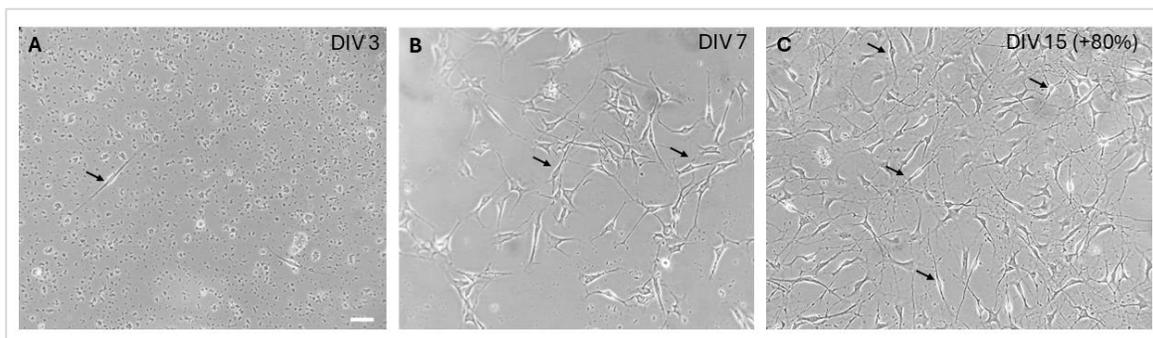
Resultados

La Generación del Trasplante se Desarrolló en Aproximadamente 15 Días

Un total de nueve ratones fueron utilizados para generar los tres trasplantes de glía envolvente. En la Figura 2, se puede observar el desarrollo de un trasplante en el tiempo, en el día 3 se puede observar el establecimiento de las primeras células con morfología bipolar con procesos delgados que definen a la GE, momento en el cual el medio DMEM/DMEM-F12 suplementado con 10% de SFB es reemplazado por el suplementado con B27, con la finalidad de limitar el crecimiento de fibroblastos y favorecer la división de la GE (Figura 2A), en el día 7 podemos ver tanto la proliferación como desarrollo de procesos celulares de la GE, en este momento se aprecian tanto células bipolares como multipolares (Figura 2B). Sin embargo, hasta el día 15 es cuando se puede observar la confluencia celular aproximada del 80%, aunque aún se ven células bipolares que se indican un proceso activo de división celular, en este momento se observa una mayor cantidad de células multipolares que, por el hecho de tener una mayor cantidad de procesos celulares, indican el establecimiento celular, con una mayor adherencia al sustrato y mayor facilidad de formar contacto entre sí (Figura 2C).

Figura 2

Generación del trasplante de GE



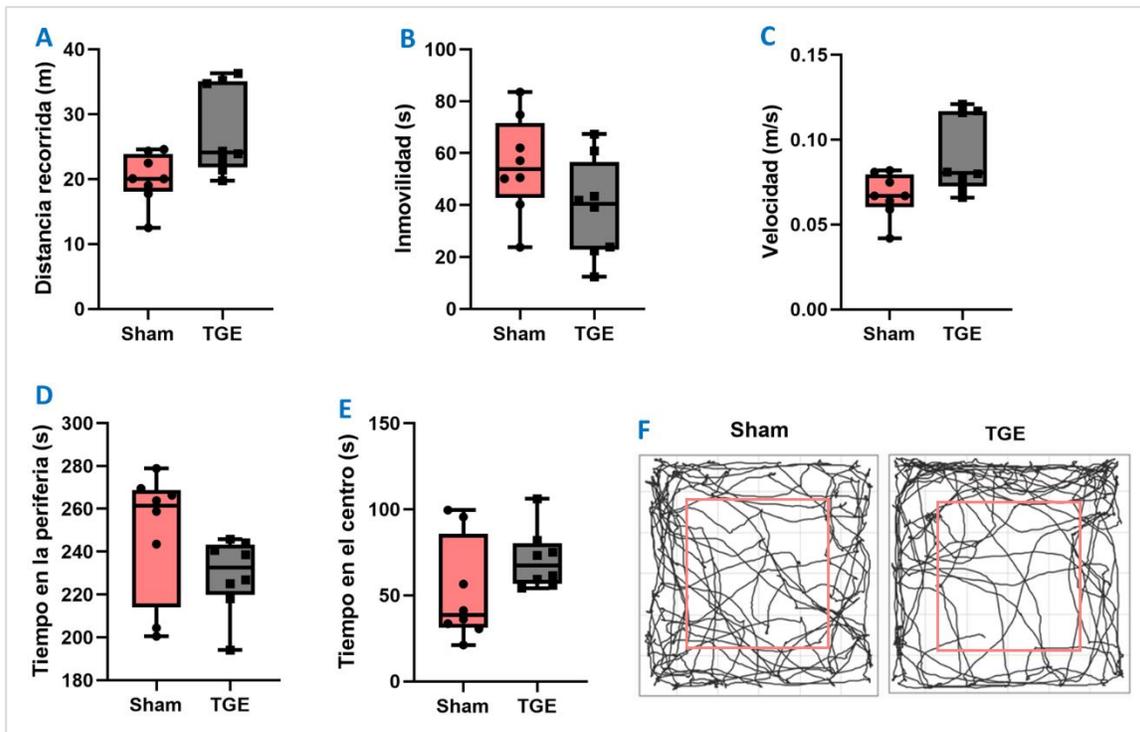
Nota. (A) Al tercer día *in vitro* (DIV) se muestra las primeras células de GE birrefringentes con morfología bipolar (flecha) y adherido al sustrato se observan los restos celulares que son producto del cultivo primario. (B) Al DIV 7 las células de GE muestran desarrollo de procesos celulares, en donde se aprecian células multipolares (flechas). (C) Al DIV 15, se observa una confluencia celular del 80%, momento en el cual la liberación de factores de crecimiento y citocinas producidas por la GE estimula la división celular. Esto se asocia a una morfología bipolar (indicada por las flechas) y al establecimiento de procesos celulares característicos de las células multipolares, incluyendo la formación de interacciones celulares. Barra 50 μ m.

El Trasplante de Glía Envoltente en la Corteza Retrosplenial No Modificó la Actividad Motora

A los ratones adultos se les realizó la cirugía estereotáxica para introducir los trasplantes en la corteza retrosplenial a la edad de P60. Durante el seguimiento postcirugía, a los ratones se les realizó inspección visual diaria y se observó ausencia de infección, hemorragia o secreción naso-oral, por ende, no se eliminaron sujetos, ni tuvimos muertes asociadas al procedimiento quirúrgico y a la inyección de las células de GE. Después de 21 días postcirugía, a los ratones se les realizó una prueba de campo abierto para evaluar su locomoción por 5 minutos. Al aplicar la prueba estadística de Mann-Whitney U, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos en los parámetros relacionados con la locomoción, como la distancia recorrida ($d = -1.29$; $U = 14$, $p = 0.065$, Figura 3A), inmovilidad ($d = -0.86$; $U = 17$, $p = 0.13$, Figura 3B), y velocidad ($d = -1.29$; $U = 13.5$, $p = 0.058$, Figura 3C). Asimismo, los ratones de ambos grupos mostraron un desplazamiento similar en los parámetros de exploración tanto en la periferia ($d = -0.77$; $U = 16$, $p = 0.10$, Figura 3D) como en el centro ($d = -0.77$; $U = 16$, $p = 0.10$, Figura 3E) de la arena (Figura 3F). Sin embargo, los ratones que recibieron el trasplante de GE mostraron tendencias en la distancia recorrida y la velocidad. Los tamaños de efecto (d de Cohen) en todos los parámetros fueron moderados y grandes en dirección negativa, indicando que hay diferencias importantes entre los grupos, donde el grupo del trasplante de GE presenta un mejor desempeño (mayor locomoción) en comparación con el grupo *sham*. Estos resultados sugieren que a los 21 días postcirugía, el trasplante de GE no modificó significativamente la locomoción en ratones, aunque con un tamaño de muestra mayor, las tendencias podrían llegar a ser significativas.

Figura 3

Evaluación de la movilidad con la prueba de campo abierto en los ratones del grupo sham y grupo del trasplante de glía envoltente (TGE)



Nota. (A) Se evaluó la distancia recorrida. (B) Inmovilidad. (C) Velocidad. (D) Tiempo en la periferia. (E) Tiempo en el centro. (F) Trayectorias de los ratones durante la prueba. Los datos están expresados con la Mediana (Rango Intercuartil [Q3-Q1]). Prueba U de Mann-Whitney. * $p < 0.05$, $n = 8$ ratones por grupo.

Discusión

Las células GE son células especializadas del sistema olfatorio que permiten la regeneración continua de las neuronas olfativas durante la vida adulta. Se ha investigado ampliamente sobre el trasplante de estas células en modelos animales con lesiones de la médula espinal, ya que la administración de GE influye en la recuperación de la función motora tras una lesión medular (Miah et al., 2021). Algunos resultados han generado dudas sobre la eficacia de las células GE para la reparación del sistema nervioso central (Deumens et al., 2006; Pearse et al., 2007). Debido a que la efectividad de los trasplantes de células GE en la reparación de la médula espinal varía debido a factores como los diferentes modelos de lesión, las técnicas de administración de células, la evaluación de los resultados funcionales y las diferencias en la pureza y rendimiento de las células trasplantadas (Miah et al., 2021). Más del 86% de estos estudios informaron mejoras neurológicas después del trasplante, incluyendo la remielinización axonal, la regeneración axonal, la recuperación electrofisiológica y funcional, y la reducción de la formación de cicatrices gliales, entre otros (Miah et al., 2021). En nuestro estudio, la

generación del trasplante de GE de ratón se realizó en un período de 15 días. Las células mostraron la morfología característica reportada para células de glía envolvente obtenidas mediante cultivo celular, siendo estas bipolares y multipolares con ramificaciones alargadas (Bautista-González et al., 2023; Gómez et al., 2007; Gudiño-Cabrera y Nieto-Sampedro, 2000).

En esta investigación, una vez que se obtuvieron los trasplantes, los ratones adultos fueron sometidos a cirugía estereotáxica para inyectar las células de GE de forma unilateral en la CR derecha. Los resultados sugieren que, a los 21 días postcirugía, el trasplante de GE en la CR derecha no modificó la locomoción en los ratones. Dado que alteraciones en la locomoción pueden evidenciar daños adversos a la salud del animal (Guest, 2019), nuestros resultados indican que tanto el procedimiento quirúrgico como la administración de las células de GE no causaron daño ni efectos adversos significativos, y no se observaron alteraciones perceptibles en la conducta de los ratones. Sin embargo, las células de GE inyectadas en la CR tampoco tuvieron efecto positivo sobre la locomoción. En contraste, otros estudios que han inyectado las células de GE en el cerebro de ratas han encontrado resultados favorables. Las ratas neonatales de la cepa Sprague-Dawley con traumatismo craneoencefálico que fueron trasplantadas con GE en la corteza de asociación parietal, mejoraron sus puntuaciones neurológicas en la Escala de Severidad Neurológica después de 7 y 14 días de la administración del trasplante (Wang et al., 2014). La NSS es una herramienta comúnmente utilizada para evaluar la función neurológica, especialmente en modelos animales de trastornos neurológicos como el accidente cerebrovascular y la lesión cerebral traumática. La NSS mide habilidades motoras, respuestas sensoriales, reflejos y comportamiento (Frank et al., 2021). Además, a nivel celular, se observó que las células trasplantadas sobrevivieron, migraron al sitio de lesión, aumentaron las fibras GAP-43 y vesículas de sinaptofisina, y redujeron las células apoptóticas (Wang et al., 2014). En otro estudio, se evaluó el efecto del trasplante GE en ratas con daño cerebral por intoxicación aguda por monóxido de carbono (CO). Los síntomas de la intoxicación aguda por CO incluyen dolor de cabeza, mialgia, mareos, deterioro neuropsicológico, confusión y pérdida de conciencia. Las ratas que recibieron la inyección de GE en el hipocampo fueron evaluadas dos semanas después mediante la prueba de la viga. Esta prueba consistió en que las ratas tenían que cruzar corriendo una viga de 2.5 cm de ancho y 2 m de longitud y se asignaba una puntuación dependiendo si lograban cruzar corriendo, arrastrando las extremidades, cojear o salirse de la viga. Las ratas con el trasplante de GE mejoraron su puntuación en esta prueba, mientras que a nivel celular la GE disminuyó el edema cerebral, aumento la expresión de proteínas como la sinaptofisina y GAD-43 (Liu et al., 2015). Es posible que en nuestro estudio al no utilizar un modelo animal con una lesión extensa en la CR no nos permitiera evaluar la recuperación funcional tras la administración de células GE. Durante el análisis de los datos, observamos algunas tendencias que sugieren que el grupo con el trasplante de GE mostró un mejor desempeño en términos de locomoción en comparación con el grupo *sham*. Sin embargo, en futuros experimentos será importante aumentar el tamaño de muestra para confirmar la significancia estadística y obtener conclusiones más robustas sobre el efecto de la administración de las células de GE en la CR.

La CR es un área indispensable para comprender el funcionamiento y la complejidad de las redes de comunicación en el cerebro, debido a que la CR forma parte del circuito que incluye a la corteza parietal, corteza somatosensorial, corteza visual, corteza auditiva, neocorteza, corteza motora, corteza cingulada anterior, hipocampo, corteza entorrinal, tálamo, hipotálamo,

cuerpo estriado y núcleo pedúnculo pontino (Motanis et al., 2021). Las neuronas de la CR exhiben una codificación combinada para señales espaciales y locomotoras relacionadas con el giro de la cabeza y la velocidad motora, lo cual sugiere que la CR procesa tanto la información espacial como la información locomotora durante la navegación (Hao et al., 2024). El circuito cortical de la CR hacia la corteza motora primaria (M1) y secundaria (M2) incluye varios tipos de neuronas excitatorias en el área descendente, lo que sugiere una comunicación directa entre las redes hipocampales dorsales que participan en la memoria espacial, mientras que las redes neocorticales están involucradas en la integración sensoriomotora y el control motor (Shibata y Naito, 2008; Yamawaki et al., 2016). El rol de la CR no solo es elemental en tareas dependientes de hipocampo, sino también en el procesamiento e integración de la información visual y motora, la cual también es indispensable para el desarrollo de la locomoción (Mao et al., 2020). Dado que la CR es esencial para diversas funciones cognitivas y motoras, es crucial en futuras investigaciones identificar tratamientos terapéuticos efectivos que ayuden a mitigar los efectos del daño en esta área.

Limitaciones y Conclusión

Una limitación de este trabajo fue no evaluar diferentes intervalos de tiempo tras la administración de las células de GE, como evaluaciones a los 3, 7 y 14 días. Esto podría proporcionar información sobre posibles daños transitorios en la locomoción. Otro aspecto para considerar es la falta de evaluación de conductas motoras finas. En estudios previos han empleado la Escala de Severidad Neurológica, que evalúa las habilidades motoras, respuestas sensoriales y reflejos (Frank et al., 2021). En este sentido, las pruebas conductuales relacionadas con la memoria (laberinto de Barnes, laberinto acuático de Morris, prueba de reconocimiento de lugar u objeto) deberían ser consideradas en el futuro para obtener una mayor comprensión del impacto de la inyección de células de GE en la CR. Otra limitación fue que no se evaluó si las células de GE inyectadas se integraron en la CR. A futuro se podría agregar el trazador PKH26 para evaluar la integración de las células trasplantadas, además de utilizar la técnica de inmunohistoquímica para analizar el fenotipo de las células de GE en la CR, tanto su morfología como marcadores característicos de la GE como GFAP, p75 y S100 β (Gudiño-Cabrera y Nieto-Sampedro, 2000). Finalmente, la utilización de un modelo animal con una lesión extensa en la CR o el uso de tetracaína permitiría evaluar el potencial de la inyección de GE en la CR sobre algún comportamiento alterado en el animal. En conclusión, la administración de GE en la CR no afectó ningún parámetro de la prueba de campo abierto, lo que sugiere que ni el procedimiento quirúrgico ni la administración de las células de GE en la CR alteran la locomoción en ratones adultos. Estos datos indican que las células de GE inyectadas en la CR son inocuas, pero no pueden ser consideradas como un trasplante efectivo en este momento, debido a que no tienen ningún efecto positivo sobre la locomoción. Sin embargo, se requieren más investigaciones para evaluar su eficacia terapéutica y explorar su potencial regenerativo en el cerebro.

Referencias

- Bautista-González, S., Carrillo González, N. J., Campos-Ordoñez, T., Acosta Elías, M. A., Pedroza-Montero, M. R., Beas-Zárate, C., y Gudiño-Cabrera, G. (2023). Raman spectroscopy to assess the differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells into a glial phenotype. *Regenerative Therapy*, 24, 528-535. <https://doi.org/10.1016/j.reth.2023.09.016>
- Burkholder, T., Foltz, C., Karlsson, E., Linton, C. G., y Smith, J. M. (2012). Health evaluation of experimental laboratory mice. *Current Protocols in Mouse Biology*, 2(2), 145-165. <https://doi.org/10.1002/9780470942390.mo110217>
- Campos-ordonez, T., y Gonzalez-perez, O. (2021). Characterization of a mouse model of chronic hydrocephalus induced by partial occlusion of the aqueduct of Sylvius in the adult brain. *Journal of Neuroscience Methods*, 362, 109294. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2021.109294>
- Campos-Ordoñez, T., S, G.-G., Eudave-Patiño, M., Buriticá, J., Herranz-Pérez, V., y Ó. García-Verdugo, JM. G.-P. (2023). Normal pressure hydrocephalus decreases the proliferation of oligodendrocyte progenitor cells and the expression of CNPase and MOG proteins in the corpus callosum before behavioral deficits occur. *Experimental Neurology*, 365, 114412. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2023.114412>
- Deumens, R., Koopmans, G. C., Honig, W. M. M., Maquet, V., Jérôme, R., Steinbusch, H. W. M., y Joosten, E. A. J. (2006). Chronically injured corticospinal axons do not cross large spinal lesion gaps after a multifactorial transplantation strategy using olfactory ensheathing cell/olfactory nerve fibroblast-biomatrix bridges. *Journal of Neuroscience Research*, 83(5), 811-820. <https://doi.org/10.1002/jnr.20768>
- Frank, D., Gruenbaum, B. F., Shelef, I., Zvenigorodsky, V., Benjamin, Y., Shapoval, O., Gal, R., Zlotnik, A., Melamed, I., y Boyko, M. (2021). A novel histological technique to assess severity of traumatic brain injury in rodents: Comparisons to neuroimaging and neurological outcomes. *Frontiers in Neuroscience*, 15, 733115. <https://doi.org/10.3389/fnins.2021.733115>
- Gómez, R., Neira, A., Tovar, D., Martínez, C., y Bernal, J. E. (2007). Células de glía envolvente olfatoria: Potencial para la reparación de lesiones del sistema nervioso central. *Universitas Médica*, 48(4), 396-413.
- Gudiño-Cabrera, G., y Nieto-Sampedro, M. (2000). Schwann-like macroglia in adult. *Glia*, 63, 49-63. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1098-1136\(200003\)30:1<49](https://doi.org/10.1002/(sici)1098-1136(200003)30:1<49)
- Gudiño-Cabrera, G., Pastor, A. M., Cruz, R. R. D. L., Delgado-García, J. M., y Nieto-Sampedro, M. (2000). Limits to the capacity of transplants of olfactory glia to promote axonal regrowth in the CNS. *NeuroReport*, 11(3), 467-471. <https://doi.org/10.1097/00001756-200002280-00008>
- Guest, P. C. (Ed.). (2019). Pre-clinical models: Techniques and protocols. Springer New York. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8994-2>
- Hao, S., Cai, R., Li, R., Li, M., Gao, L., y Li, X. (2024). Conjunctive processing of spatial border and locomotion in retrosplenial cortex during spatial navigation. *The Journal of Physiology*, 602(19), 5017–5038. <https://doi.org/10.1113/JP286434>

- Liu, W., Zheng, Q., Wang, Y., Han, X., Yuan, L., y Zhao, M. (2015). Transplantation of olfactory ensheathing cells attenuates acute carbon monoxide poisoning-induced brain damages in rats. *Neurochemical Research*, 40(1), 70-80. <https://doi.org/10.1007/s11064-014-1467-z>
- Maguire, E. A. (2012). Eleanor A. Maguire. *Current Biology*, 22(24), R1025-R1027. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.10.007>
- Mao, D., Molina, L. A., Bonin, V., y McNaughton, B. L. (2020). Vision and locomotion combine to drive path integration sequences in mouse retrosplenial cortex. *Current Biology*, 30(9), 1680-1688.e4. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.02.070>
- Miah, M., Ferretti, P., y Choi, D. (2021). Considering the cellular composition of olfactory ensheathing cell transplants for spinal cord injury repair: A review of the literature. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 15, 781489. <https://doi.org/10.3389/fncel.2021.781489>
- Mitchell, A. S., Czajkowski, R., Zhang, N., Jeffery, K., y Nelson, A. J. D. (2018). Retrosplenial cortex and its role in spatial cognition. *Brain and Neuroscience Advances*, 2, 1-13. <https://doi.org/10.1177/2398212818757098>
- Motanis, H., Khorasani, L. N., Giza, C. C., y Harris, N. G. (2021). Peering into the brain through the retrosplenial cortex to assess cognitive function of the injured brain. *Neurotrauma Reports*, 2(1), 564-580. <https://doi.org/10.1089/neur.2021.0044>
- Nakhjavan-Shahraki, B., Yousefifard, M., Rahimi-Movaghar, V., Baikpour, M., Nasirinezhad, F., Safari, S., Yaseri, M., Moghadas Jafari, A., Ghelichkhani, P., Tafakhori, A., y Hosseini, M. (2018). Transplantation of olfactory ensheathing cells on functional recovery and neuropathic pain after spinal cord injury; systematic review and meta-analysis. *Scientific Reports*, 8(1), 325. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-18754-4>
- National Research Council. (2003). *Guidelines for the care and use of mammals in neuroscience and behavioral research* (p. 10732). National Academies Press. <https://doi.org/10.17226/10732>
- Paxinos, G., y Franklin, K. B. J. (2001). *The mouse brain in stereotaxic coordinates* (2a. ed.). Academic Press.
- Pearse, D. D., Sanchez, A. R., Pereira, F. C., Andrade, C. M., Puzis, R., Pressman, Y., Golden, K., Kitay, B. M., Blits, B., Wood, P. M., y Bunge, M. B. (2007). Transplantation of Schwann cells and/or olfactory ensheathing glia into the contused spinal cord: Survival, migration, axon association, and functional recovery. *Glia*, 55(9), 976-1000. <https://doi.org/10.1002/glia.20490>
- Ruggiero, G., Frassinetti, F., Iavarone, A., y Iachini, T. (2014). The lost ability to find the way: Topographical disorientation after a left brain lesion. *Neuropsychology*, 28(1), 147-160. <https://doi.org/10.1037/neu0000009>
- Shibata, H., y Naito, J. (2008). Organization of anterior cingulate and frontal cortical projections to the retrosplenial cortex in the rat. *Journal of Comparative Neurology*, 506(1), 30-45. <https://doi.org/10.1002/cne.21523>
- Takeuchi, T., Tamura, M., Tse, D., Kajii, Y., Fernández, G., y Morris, R. G. M. (2022). Brain region networks for the assimilation of new associative memory into a schema. *Molecular Brain*, 15(1), 1-14. <https://doi.org/10.1186/s13041-022-00908-9>

- Tatem, K. S., Quinn, J. L., Phadke, A., Yu, Q., Gordish-Dressman, H., y Nagaraju, K. (2014). Behavioral and locomotor measurements using an open field activity monitoring system for skeletal muscle diseases. *Journal of Visualized Experiments*, 91, 51785. <https://doi.org/10.3791/51785>
- Vann, S. D., y Aggleton, J. P. (2002). Extensive cytotoxic lesions of the rat retrosplenial cortex reveal consistent deficits on tasks that tax allocentric spatial memory. *Behavioral Neuroscience*, 116(1), 85-94. <https://doi.org/10.1037/0735-7044.116.1.85>
- Verdú, E., García-Alías, G., Forés, J., Gudiño-Cabrera, G., Muñetón, V. C., Nieto-Sampedro, M., y Navarro, X. (2001). Effects of ensheathing cells transplanted into photochemically damaged spinal cord. *NeuroReport*, 12(11), 2303-2309. <https://doi.org/10.1097/00001756-200108080-00005>
- Wang, Y.-C., Xia, Q.-J., Ba, Y.-C., Wang, T.-Y., LiN, N., Zou, Y., Shang, F.-F., Zhou, X.-F., Wang, T.-H., Fu, X.-M., y Qi, J.-G. (2014). Transplantation of olfactory ensheathing cells promotes the recovery of neurological functions in rats with traumatic brain injury associated with downregulation of Bad. *Cytotherapy*, 16(7), 1000-1010. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2013.12.009>
- Watzlawick, R., Rind, J., Sena, E. S., Brommer, B., Zhang, T., Kopp, M. A., Dirnagl, U., Macleod, M. R., Howells, D. W., y Schwab, J. M. (2016). Olfactory ensheathing cell transplantation in experimental spinal cord injury: Effect size and reporting bias of 62 experimental treatments: A systematic review and meta-analysis. *PLoS Biology*, 14(5), 1-16. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002468>
- Yamawaki, N., Radulovic, J., y Shepherd, G. M. G. (2016). A corticocortical circuit directly links retrosplenial cortex to M2 in the mouse. *The Journal of Neuroscience*, 36(36), 9365-9374. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1099-16.2016>